葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃体外发酵参数及微生物区系的影响

杨德莲[1]　童津津[1]　张　婕[1]　郭　琪[1]　蒋琦晖[1]　蒋林树[1*]　熊本海[2*]

（1. 北京农学院动物科技术学院，奶牛营养学北京市重点实验室，北京　102206；2. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所，北京　100193）

摘　要：本试验旨在通过体外培养法研究葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃发酵参数及微生物区系的影响。试验分为 6 组，以 500 g 精粗比为 40∶60 的全混合日粮为发酵底物，各组分别添加 0（对照）、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 的葡萄籽原花青素。体外发酵 24 h 后，读取产气量及测定瘤胃发酵参数和微生物含量。结果表明，与对照组相比：1）添加 0.4 和 0.5 g/kg 的葡萄籽原花青素显著降低了发酵液丁酸和异戊酸的含量（$P<0.05$），而添加 0.2 g/kg 的葡萄籽原花青素显著提高了发酵液异丁酸的含量（$P<0.05$）；2）添加不同水平的葡萄籽原花青素均显著提高了发酵液 pH（$P<0.05$）；3）添加不同水平的葡萄籽原花青素有减少体外发酵产气量的作用，其中 0.3 g/kg 组效果显著（$P<0.05$），而 0.2 g/kg 组显著降低了甲烷产量（$P<0.05$）；4）葡萄籽原花青素能显著降低了发酵液中的原虫（0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 组）、甲烷菌（0.1、0.2、0.4、0.5 g/kg 组）、溶纤维丁酸弧菌（0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 组）和产琥珀酸丝状杆菌含量（0.1、0.3、0.4、0.5 g/kg 组）（$P<0.05$）。由此可见，在奶牛瘤胃体外发酵液中添加葡萄籽原花青素改善了瘤胃发酵模式，显著影响了瘤胃微生物区系，显著降低了甲烷产量，0. 2 g/kg 的添加水平较为适宜。

关键词：葡萄籽原花青素;奶牛;瘤胃液;体外发酵;微生物区系

中图分类号：S816.7

葡萄原花青素是葡萄果实中含有的酚类物质，其籽中含量较多[1-3]。它具有抗氧化[4-5]、清除自由基[6]、抗辐射和抗应激[7-8]等生物学作用。其在反刍动物及猪饲养中的添加试验国内外均有报道[9-18]。国内葡萄籽原花青素对奶牛生产性能方面的影响研究和对羊瘤胃发酵试

收稿日期：2017-07-25
基金项目：国家“十三五”重点研发计划（2016YFD0700201，2016YFD0700205）；北京市农业局“北京市现代农业产业技术体系奶牛创新团队”
作者简介：杨德莲（1993-），女，云南昭通人，硕士研究生，研究方向为反刍动物营养与免疫。E-mail: 1121529738@qq.com
*通信作者：蒋林树，教授，博士生导师，E-mail:kjxnb@vip.sina.com；熊本海，研究员，博士生导师，xiongbanhai@caas.cn

验报道较多[9-14]，而对奶牛瘤胃发酵及微生物区系影响的系统研究报道较少，有必要继续深入此方面的研究。

目前，通过添加植物皂苷类物质来改善家畜生产性能有着广阔的应用前景，尤其在调控奶牛瘤胃发酵等方面，成为当今研究的热点[19-21]。吴建敏等[9]研究报道，用葡萄渣代替部分玉米、麸皮和豆粕，或者添加适当比例的葡萄籽粕饲喂奶牛[10]，对产奶性能、乳品品质和日产效益均没有不良影响，且有利于乳脂率和生产效益的改善。Gessner 等[11]用葡萄籽粕替代等比例的苜蓿干草饲喂奶牛提高了奶牛的产奶量和乳脂率，还能降低体细胞数。孙占鹏等[12]研究发现，饲喂成年羊葡萄渣，羊生产性能和饲料转化效率均有显著改善。赵栋等[13]研究表明，添加葡萄渣能够提高绵羊的氮表观消化率和留存率，能提高绵羊瘤胃液丙酸含量、降低丁酸和乙酸/丙酸对瘤胃液 pH 的影响。李会菊等[14]在饲粮中添加不同水平的葡萄渣和葡萄籽对成年小尾寒羊平均日增重、粗蛋白质和能量的表观消化率效果尤为显著。同时，大量的研究报道发现，葡萄籽原花青素还对断奶仔猪的生产性能、肠道消化酶活性[15]、免疫力[16]、抗氧化能力[17]、繁殖性能[18]等方面均有改善。

综合来看，目前关于葡萄籽原花青素调控奶牛体外发酵模式的报道较少，尤其是对奶牛瘤胃发酵参数及微生物区系的影响。因此，本试验旨在通过体外法研究葡萄籽原花青素对奶牛瘤胃发酵参数及微生物区系的影响，为葡萄籽原花青素作为调控奶牛瘤胃发酵添加剂应用于生产实践提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

发酵底物：北京某奶牛养殖场精粗比为40∶60的全混合饲粮（TMR），干物质（DM）含量为54.80%，粗蛋白质（CP）含量为15.68%，中性洗涤纤维（NDF）含量为39.80%，经烘干粉碎过40目筛，其组成及营养水平见表1。

葡萄籽原花青素：购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司，含花青素单聚体18.4%，二聚体20.4%，三聚体15.2%，四聚体14.1%，低聚体（5~13个单位）28.5%，酚醛类物质4.3%。

缓冲液：试验所用缓冲液按照 Menke 等[19]的方法配制而成，配制后持续通入 CO_2 并于 39 ℃水浴中保存备用。

表1　发酵底物组成及营养水平(干物质基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of the fermentation substrate (DM basis) %

项目 Items	含量 Content
原料 Ingredients	
苜蓿干草 Alfalfa hay	13.24
羊草 *Leymus chinensis*	11.20
玉米 Corn	13.27
全棉籽 Whole cottonseed	2.80
青贮玉米 Corn silage	34.57
干酒糟及其可溶物 DDGS	2.99
蒸汽压片玉米 Steam-flaked corn	6.16
豆粕 Soybean meal	9.53
棉籽粕 Cottonseed meal	3.87
预混料 Premix[1)]	1.96
食盐 NaCl	0.41
合计 Total	100.00
营养水平 Nutrient levels[2)]	
产奶净能 NE_L/(MJ/kg)	7.26
粗脂肪 EE	3.04
粗蛋白质 CP	15.68
中性洗涤纤维 NDF	39.80
酸性洗涤纤维 ADF	23.26
钙 Ca	0.90
磷 P	0.41

[1)] 预混料为每千克底物提供 The premix provided following per kg of the substrate：Cu 800 mg, Mn 1 200 mg,Zn 3 300 mg,Se 30 mg,Co 20 mg,Fe 1 400 mg,I 70 mg,VA 1 100 000 IU,VD 330 000 IU, VE 3 000 IU。

[2)] 产奶净能为计算值，产奶净能=0.550 1×消化能-0.094 6[20]，其他营养水平为实测值。NE_L was a calculated value， NE_L=0.550 1×DE-0.094 6[20], while other nutrient levels were measured values.

瘤胃液：选用 4 头健康荷斯坦瘘管奶牛，其饲粮精粗比为 40:60（羊草 700 g/kg 和精料补充料 300 g/kg），晨饲前取瘤胃内容物，混合后在 39 ℃水浴环境中经 4 层纱布过滤，装于保温瓶迅速带回实验室，操作应在尽量短的时间内完成[21]。

1.2 试验设计

本试验采用单因素 6 水平试验设计，将 500 mg 发酵底物置于 150 mL 厌氧发酵瓶中，各组葡萄籽原花青素的添加量分别为 0（对照）、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg，每组 6 个重复。接种时迅速将每个瓶中加入预热的缓冲液 50 mL 和经 4 层纱布过滤的新鲜瘤胃液 25 mL，向瓶中持续通入 CO_2 5 s 后，立即加上瓶塞，并将每个发酵瓶与产气装置的每个传感器相连接[22]，于 39 ℃下连续培养 24 h，试验重复 3 次。

1.3　样品采集和测定分析

1.3.1　发酵液样品采集与处理

待培养管在体外培养 24 h 后，将培养管取出放入冰水浴中使发酵停止。将培养管中的发酵液取出，放入至已知质量的 50 mL 塑料离心管，立即测定发酵液的 pH。发酵液在 5 000 ×*g* 离心 10 min，取上清液用于氨态氮（NH_3-N）、微生物蛋白（MCP）和挥发性脂肪酸（VFA）含量的测定，具体操作按照严淑红等[24]的方法。

1.3.2　产气量和甲烷产量

使用沈英等[24]研制的 AGRS-III微生物发酵微量产气自动记录仪测定 24 h 产气量。收集发酵 24 h 后的气体，使用安捷伦 7890B 型号气相色谱仪测定甲烷产量，色谱仪条件为：TCD 检测器，载气为氢气，流量 28 mL/min，PorapakQ 填充柱，检测器温度 100 ℃，进样口温度 150 ℃，柱温 38 ℃，进样量 1 mL。

1.3.2　总DNA提取和细菌相对定量

通过珠磨-十六烷基三甲基溴化铵（CTAB）法提取发酵液总DNA[25]。实时定量PCR的引物参照文献[23]的报道，引物序列见表2。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。参照SYBR Premix Ex Taq™试剂建立20 μL反应体系及反应条件[26]，每个样品3个重复。根据qRT-PCR测得的阈值循环(Ct)和以下公式将目标菌含量表示为相对于瘤胃总菌16S rDNA的百分比：

$$目标菌含量(\%)=100\times2^{-(Ct^{目标菌}-Ct^{总细菌})}$$[25]。

表 2　实时定量 PCR 引物序列

Table 2　Sequences of primers for qRT-PCR

项目 Items	序列 Sequences(5′-3′)
总菌 Total bacteria	F：CGGCAACGAGCGCAACCC
	R：CCATTGTAGCACGTGTGTAGCC
甲烷菌 Methanogen	F：TTCGGTGGATCDCARAGRGC
	R：GBARGTCGWAWCCGTAGAATCC
真菌 Fungi	F：GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC
	R：CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT
原虫 Protozoa	F：GCTTTCGWTGGTAGTGTATT
	R：CTTGCCCTCYAATCGTWCT
产琥珀酸丝状杆菌 *Fibrobacter succinogenes*	F：GTTCGGAATTACTGGGCGTAAA
	R：CGCCTGCCCCTGAACTATC
黄色瘤胃球菌 *Ruminococcus flavefaciens*	F：CGAACGGAGATAATTTGAGTTTACTTAGG
	R：CGGTCTCTGTATGTTATGAGGTATTACC
溶纤维丁酸弧菌 *Butyrivibrio fibrisolvens*	F：TAACATGAGTTTGATCCTGGCTC
	R：CGTTACTCACCCGTCCGC
白色瘤胃球菌 *Ruminococcus albus*	F：GTTTTAGGATTGTAAACCTCTGTCTT
	R：CCTAATATCTACGCATTTCACCGC

1.4　数据统计与分析

数据用SPSS 17.0软件中的one-way ANOVE程序进行单因素方差分析，采用Duncan氏法进行平均值的多重比较。显著性评判标准为P<0.05。

2　结　果

2.1　葡萄籽原花青素对发酵液瘤胃发酵参数的影响

如表 3 所示，与对照组相比，添加不同水平的葡萄籽原花青素均显著提高了发酵液 pH（P<0.05），其中以 0.3 g/kg 组的值最高（pH=6.3）（P<0.05）。发酵液氨态氮含量的变化范围为 37.29~47.43 mg/dL，0.2 g/kg 组的值最低，显著低于对照组（P<0.05），0.4 g/kg 组的值最高，显著高于对照组（P<0.05）。与对照组相比，0.2 g/kg 组显著降低了甲烷产量（P<0.05）；0.3 g/kg 组显著降低了产气量（P<0.05）。各组发酵液微生物蛋白含量没有显著差异（P>0.05）。

表 3　葡萄籽原花青素对发酵液瘤胃发酵参数的影响

Table 3　Effects of grape seed procyanidine on rumen fermentation parameters of fermentation fluid

项目 Items	葡萄籽原花青素添加水平 Grape seed procyanidine supplemental levels(g/kg)						标准误 SEM	线性 Linear	P 值 *P*-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5			
pH	6.22[b]	6.28[a]	6.29[a]	6.31[a]	6.29[a]	6.28[a]	0.01	<0.01	<0.01
氨态氮 NH_3-N/(mg/dL)	39.70[b]	41.40[abc]	37.29[c]	41.60[abc]	47.43[a]	44.60[abc]	2.92	0.88	<0.05
微生物蛋白 MCP/(mg/mL)	1.61	1.43	1.30	1.41	1.43	1.32	0.08	0.85	0.05
甲烷产量 CH_4 production/%	22.40[a]	21.10[ab]	19.00[b]	20.70[ab]	20.70[ab]	21.30[ab]	0.27	<0.01	<0.01
产气量 Gas production/mL	78.10[a]	77.10[ab]	70.90[ab]	64.66[b]	73.47[ab]	74.46[ab]	2.51	<0.01	<0.01

同行数据肩标不同小写字母表示差异显著（*P*<0.05），相同或无字母肩标表示差异不显著（*P*>0.05）。下表同。

Values in the same row with different small letter superscripts mean significant difference (*P*<0.01), while with the same or no letter superscripts mean no significant difference (*P*>0.05). The same as below.

2.2 葡萄籽原花青素对发酵液挥发性脂肪酸含量的影响

如表 4 所示，与对照组相比，添加不同水平的葡萄籽原花青素对发酵液总挥发性脂肪酸、乙酸、丙酸、戊酸含量及乙酸/丙酸均无显著影响（*P*>0.05）。添加 0.4 和 0.5 g/kg 的葡萄籽原花青素显著降低了发酵液丁酸和异戊酸的含量（*P*<0.05）。添加 0.2 g/kg 的葡萄籽原花青素显著提高了发酵液异丁酸含量（*P*<0.05）。

表 4　葡萄籽原花青素对发酵液挥发性脂肪酸含量的影响

Table 4　Effects of grape seed procyanidine on volatile fatty acid contents of fermentation fluid

项目 Items	葡萄籽原花青素添加水平 Grape seed procyanidine supplemental levels(g/kg)						标准误 SEM	线性 Linear	*P* 值 *P*-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5			
总挥发性脂肪酸 TVFA/(mmol/L)	94.10	101.60	104.30	98.00	103.70	92.00	5.27	0.54	0.50
乙酸 Acetic acid/%	60.80	61.80	61.70	61.90	61.90	62.50	0.42	0.09	0.18
丙酸 Propionic acid/%	19.40	21.70	19.80	19.80	19.80	20.18	0.79	0.87	0.40
乙酸/丙酸 Acetic acid/propionic acid	3.12	2.92	3.11	3.11	3.12	3.09	0.08	0.39	0.49
丁酸 Butyric acid/%	18.70[a]	18.40[ab]	18.10[ab]	18.10[ab]	17.90[b]	17.90[b]	0.14	<0.01	<0.01
异丁酸 Isobutyrate/%	1.03[b]	1.09[ab]	1.10[a]	1.06[ab]	1.04[ab]	1.07[ab]	0.01	0.14	<0.05
戊酸 Valerate acid/%	1.90	1.97	1.85	1.76	1.74	1.83	0.07	0.15	0.34
异戊酸 Isovalerate/%	2.55[b]	2.58[a]	2.53[abc]	2.51[abc]	2.48[c]	2.45[c]	0.01	0.03	<0.01

2.3 葡萄籽原花青素对发酵液微生物含量的影响

如表 5 所示，与对照组相比，0.2、0.3、0.4、0.5 g/kg 组显著降低了发酵液原虫、溶纤维丁酸弧菌含量（P<0.05），0.1、0.2、0.4、0.5 g/kg 组显著降低了发酵液甲烷菌含量（P<0.05），0.3、0.4、0.5 g/kg 组显著提高了发酵液真菌含量（P<0.05），0.1、0.3、0.4、0.5 g/kg 组显著降低了发酵液产琥珀酸丝状杆菌含量（P<0.05）。各组发酵液黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌的含量没有显著差异（P＞0.05）。

表 5　葡萄籽原花青素对发酵液微生物含量的影响

Table 5　Effects of grape seed procyanidine on microorganism contents of fermentation fluid

项目 Items	葡萄籽原花青素添加水平 Grape seed procyanidine supplemental levels(g/kg)						标准误 SEM	线性 Linear	P 值 P-value
	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5			
原虫 Protozoa/%	3.75^{a}	3.64^{a}	2.35^{c}	2.37^{bc}	2.40^{bc}	2.74^{b}	0.36	0.34	<0.01
甲烷菌 Methanogens/×10^{-2}%	2.18^{a}	1.51^{bc}	1.47^{bc}	1.91^{ab}	1.57^{bc}	1.16^{c}	0.42	0.10	<0.01
真菌 Fungi/×10^{-2}%	1.81^{d}	1.94^{d}	2.22^{cd}	2.5^{bc}	2.79^{b}	3.29^{a}	0.38	0.82	<0.01
溶纤维丁酸弧菌 *Butyrivibrio fibrisolvens*/%	2.09^{a}	1.48^{ab}	1.16^{bc}	1.00^{bc}	0.89^{c}	0.81^{c}	0.45	0.53	<0.01
产琥珀酸丝状杆菌 *Fibrobacter succinogenes*/%	1.75^{a}	1.57^{bc}	1.49^{abc}	1.32^{bcd}	1.23^{dc}	1.09^{d}	0.31	0.26	<0.01
黄色瘤胃球菌 *Ruminococcus flavefaciens*/×10^{-3}%	11.11	10.50	10.70	10.99	11.65	11.00	0.65	0.03	0.09
白色瘤胃球菌 *Ruminococcus albus*/%	0.54	0.53	0.55	0.51	0.52	0.53	0.07	0.07	0.64

3　讨　论

3.1　葡萄籽原花青素对发酵液瘤胃发酵参数的影响

氨态氮是反刍动物瘤胃消化代谢的重要产物，同时也是大部分微生物合成菌体蛋白的原料，其含量直接反映了瘤胃内环境的发酵情况。在本试验中，适量添加葡萄籽原花青素能够显著降低发酵液氨态氮的含量。据报道，瘤胃液氨态氮含量如果过高，则会经瘤胃吸收进入血液，加重机体对氮的代谢负担[27]，不仅造成氮源的浪费，动物还易发生氨中毒。在本试验中，葡萄籽原花青素添加水平为 0.2 g/kg 时，显著降低了发酵液氨态氮的含量。若含氮物质供应不足，则微生物生长受阻，动物的生产性能降低；而此时，微生物蛋白的含量也达到

最低值。氨态氮含量与微生物蛋白含量密切相关[28]。米热古丽·伊马木等[29]报道，通过体外培养法，添加葡萄籽精油可降低发酵液氨态氮含量。李冲等[30]研究发现，饲喂葡萄渣可显著减低羔羊的瘤胃液氨态氮含量。李成云等[31-32]的研究发现，在体外试验中添加富含缩合单宁的物质能够降低发酵液中的微生物蛋白含量。Wang 等[33]研究表明，在反刍动物饲粮中添加富含缩合单宁物质能够显著降低瘤胃中蛋白质的降解。潘发明等[34]研究表明，饲粮中的单宁含量越高越则对微生物蛋白的抑制作用就越明显。有研究报道，体外发酵液 NH_3-N 含量与产气量存在高度正相关（r>0.99）[35]，与本试验的研究结果一致，添加不同水平的葡萄籽原花青素不仅降低了发酵液氨态氮的含量，而对产气量具有抑制作用。邸凌峰等[36]研究发现，单宁含量与产气量呈负相关。李晓鹏[37]在缩合单宁对体外瘤胃发酵影响的研究中得出，单宁破坏了瘤胃中部分细菌的膜，使细菌不能正常繁殖，同时阻止了酶与底物的结合，最终影响瘤胃发酵，导致产气量降低。

3.2　葡萄籽原花青素对发酵液挥发性脂肪酸含量的影响

在反刍动物中 VFA 作为能量的主要来源，其含量及组成比例直接反映了瘤胃代谢活动水平。瘤胃发酵过程中所产生的 VFA，主要以乙酸、丙酸、丁酸为主，占 TVFA 的 95%左右，同时，发酵产生 VFA 的过程中有能量释放生成 ATP，可被微生物作为能源用于微生物蛋白的合成[38]。本试验中，发酵液 TVFA 以及乙酸/丙酸在各组间没有显著差异，但是随着葡萄籽原花青素添加水平的增加，对丁酸的生成具有显著抑制作用，这与吕忠雷[39]、米热古丽·伊马木等[29]、赵栋等[13]的研究结果相一致。本试验发现，葡萄籽原花青素对发酵液异丁酸含量也有显著的影响。本试验中，发酵液 pH 在 6.22～6.31，均在正常范围内[38]，对瘤胃微生物的生长无不良影响。该研究结果与李晓鹏[37]和李成云[32]的研究结果相似，在体外发酵试验中，添加富含缩合单宁物质能够提高发酵液 pH。由此可见，葡萄籽原花青素可改变体外瘤胃发酵模式。

3.3　葡萄籽原花青素对发酵液微生物含量的影响

本试验中，葡萄籽原花青素显著降低了发酵液原虫及甲烷菌的含量。据报道，原虫在瘤胃中主要以细菌、真菌等为主要捕食对象，其代谢过程中会产生大量的甲烷，与甲烷菌存在共生关系[40]。因此，有文献报道指出可以通过驱除原虫来减少甲烷菌，进而降低甲烷的排放量[41]。王慧玲[42]在体外试验中添加单宁酸及 Anantasook 等[43]在饲粮添加缩合单宁均发现

显著降低了瘤胃内的原虫的数量，与本试验结果一致，可能是因为破坏了某种原虫的生活环境或者是直接作用于原虫，从而导致原虫数量的降低。据报道，原虫为甲烷菌提供生长物质，而甲烷菌又含有与甲烷生成相关的辅酶[44]。本试验结果表明，添加葡萄籽原花青素后显著降低了发酵液甲烷菌的含量，这与赵薇[45]的研究结果一致。瘤胃中甲烷的产生大部分是甲烷菌的直接作用结果，因此减少甲烷菌对于甲烷减排具有重要作用。

在反刍动物瘤胃微生物降解纤维素的作用中真菌和细菌占主要地位。Wood 等[46]通过体外研究表明，瘤胃内的真菌对纤维素的降解具有促进作用。袁英良[47]研究发现，在体外试验中添加单宁酸能够显著增加瘤胃内真菌的数量。这与本试验研究结果相似，通过添加葡萄籽原花青素能够显著提高发酵液真菌的含量。研究发现，瘤胃真菌分泌的纤维素分解酶的活性较高，但是真菌的繁殖速度较慢，所以细菌占主导地位[48]。瘤胃细菌主要包括溶纤维丁酸弧菌、黄色瘤胃球菌、白色瘤胃球菌及产琥珀酸丝状杆菌。溶纤维丁酸弧菌是一种厌氧革兰氏阳性菌，对于瘤胃内蛋白质的降解具有重要作用。因其具有蛋白质降解酶的活性，当饲粮中含有抗性蛋白质则酶的活性则被抑制。本试验结果表明，葡萄籽原花青素显著降低了溶纤维丁酸弧菌的含量，这与赵薇[45]研究结果一致，可能是由于葡萄籽原花青素里的缩合单宁是一种植物性的抗性蛋白质，同时也可能是因为缩合单宁与饲粮中的蛋白质结合形成了复合物，最终导致溶纤维丁酸弧菌的含量降低。

产琥珀酸丝状杆菌为一种革兰氏阴性菌，其纤维素分解活性较高[44]。在纯培养的条件下，产琥珀酸丝状杆菌降解能力较强，如能降解结构性坚韧物质，还能降解部分黄色瘤胃球菌不能降解的纤维素，且产琥珀酸丝状杆菌对抗生素具有很强的耐受能力[49]。本试验中，葡萄籽原花青素显著降低了发酵液产琥珀酸丝状杆菌的含量。王川[50]报道缩合单宁对产琥珀酸丝状杆菌的细胞内源酶和外源酶均具有强烈的抑制作用，所以减少了产琥珀酸丝状杆菌的数量，与本试验的研究结果一致。

反刍动物瘤胃内的瘤胃球菌主要有黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌，在纤维素分解中起主要作用。黄色瘤胃球菌与白色瘤胃球菌之间既有协同作用也有抑制作用，白色瘤胃球菌可产生多种细菌素，并且所产生的这些细菌素对黄色瘤胃球菌的生长具有抑制作用[51]。李大彪等[52]研究发现，饲粮中添加单宁可显著降低山羊瘤胃液白色瘤胃球菌和黄色瘤胃球菌含量。然而，本试验添加葡萄籽原花对发酵液黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌菌没有显著的影响，这

可能由于体内复杂的瘤胃内环境与体外试验条件的差异所致。

4 结 论

① 葡萄籽原花青素可提高发酵液 pH，但均在正常生理范围之内；适宜添加水平的葡萄籽原花青素可降低发酵液 NH_3-N 含量、提高发酵液异丁酸含量、降低产气量和甲烷产量，超过 0.2 g/kg 时会促进 NH_3-N 的释放及抑制丁酸和异戊酸生成；葡萄籽原花青素对发酵液总挥发性脂肪酸、乙酸、丙酸、戊酸含量及乙酸/丙酸均无显著影响。

② 葡萄籽原花青素可降低发酵液中原虫、甲烷菌、溶纤维丁酸弧菌和产琥珀酸丝状杆菌含量；葡萄籽原花青素对发酵液黄色瘤胃球菌和白色瘤胃球菌无显著影响。

③ 综合认为，在奶牛瘤胃体外发酵条件下，葡萄籽原花青素的适宜添加水平为 0.2 g/kg。

参考文献：

[1] PRIEUR C,RIGAUD J,CHEYNIER V,et al.Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds[J].Phytochemistry,1994,36(3):781–784.

[2] 黄艺宁.葡萄原花青素研究及其 ANR 基因的克隆[D].硕士学位论文.福州:福建农林大学,2008.

[3] 万本屹,李宏,董海洲.葡萄籽原花青素提取及其应用研究进展[J].粮食与油脂,2002(2):43–45.

[4] VITSEVA O,VARGHESE S,CHAKRABATI S,et al.Grape seed and skin extracts alter platelet function and release of reactive oxygen species[J].Journal of the American College of Cardiology,2004,43(Suppl.2):A518.

[5] 尹进,胡怡秀,胡余明,等.葡萄籽原花青素提取物对小鼠 MDA、SOD 和 GSH-Px 的影响[J].中国热带医学,2007,7(8):1285–1286.

[6] BAYATLI F,AKKUS D,KILIC E,et al.The protective effects of grape seed extract on MDA,AOPP,apoptosis and eNOS expression in testicular torsion:an experimental study[J].World Journal of Urology,2013,31(3):615–622.

[7] CHARRADI K,EIKAHOUI S,KARKOUCH I,et al.Grape seed and skin extract alleviates high-fat diet-induced renal lipotoxicity and prevents copper depletion in rat.[J].Applied Physiology,Nutrition,and Metabolism,2013,38(3):259–267.

[8] 刘相菊,高海青,邱洁,等.葡萄籽原花青素对兔动脉粥样硬化氧化应激的影响[J].山东大学学报:医学版,2010,48(8):25–27.
[9] 吴建敏,承尧兴,徐俊,等.葡萄籽残渣饲喂奶牛的效果研究[J].中国畜牧杂志,2007,43(7):62–63.
[10] 杜道全,杨文华.葡萄籽粕在奶牛日粮中的应用研究[J].河南畜牧兽医:综合版,2009,30(8):28–29.
[11] GESSNER D K,WINKLER A,KOCH C,et al.Analysis of hepatic transcript profile and plasma lipid profile in early lactating dairy cows fed grape seed and grape marc meal extract[J].BMC Genomics,2017,18(1):253.
[12] 孙占鹏,王曦,李会菊,等.日粮中添加不同剂量葡萄渣对成年羊增重效果的影响[J].中国草食动物科学,2010,30(1):46–48.
[13] 赵栋,郑琛,李发弟,等.葡萄渣单宁对绵羊养分消化代谢及瘤胃发酵的影响[J].草业学报,2014,23(4):285–292.
[14] 李会菊,孙占鹏.日粮中添加葡萄渣对小尾寒羊成年母羊体重的影响[J].饲料工业,2010,31(3):33–36.
[15] 解玲娜,茅婷婷,刘畅,等.葡萄籽原花青素对断奶仔猪消化道酶活、内脏相对重量及血细胞参数的影响[J].北京农学院学报,2012,27(4):13–15.
[16] 赵家奇,郝瑞荣,高俊杰,等.葡萄籽原花青素对断奶仔猪免疫力和抗氧化功能的影响[J].山西农业大学学报:自然科学版,2016,36(10):735–739.
[17] 赵娇,周招洪,梁小芳,等.葡萄籽原花青素及维生素 E 对氧化应激仔猪生长性能、血清氧化还原状态和肝脏氧化损伤的影响[J].中国农业科学,2013,46(19):4157–4164.
[18] 刘海燕,于维,苏秀侠,等.葡萄籽饲喂生长育肥猪的饲养试验[J].黑龙江畜牧兽医,2008(11):35–36.
[19] MENKE K H,STEINGASS H． Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid[J].Animal Research Development,1988,28(1) :7－55.
[20] 冯仰廉,陆治年.奶牛营养需要和饲料成分[M].3 版.北京:中国农业出版社,2007.

[21] 周敏,叶子弘,蒋林树.瘤胃氢化多不饱和脂肪酸的影响因素[J].中国农学通报,2010,26(8):38–44.

[22] 潘龙,牛俊丽,卜登攀,等.柴胡皂苷对体外发酵参数及细菌数量变化的影响[J].草业学报,2015,24(6):85–91.

[23] 严淑红,赵士萍,蒋琦晖,等.茶皂素对奶牛瘤胃发酵及瘤胃微生物区系的影响[J].动物营养学报,2016,28(8):2485–2496.

[24] 沈英,宋正河,杨红建,等.基于虚拟仪器技术的饲料体外发酵产气自动记录系统的研制[J].农业工程学报,2006,22(12):159–163.

[25] BÜRGMANN H,PESARO M F,WIDMER F,et al.A strategy for optimizing quality and quantity of DNA extracted from soil[J].Journal of Microbiological Methods,2001,45(1):7–20.

[26] 刘薇,辛杭书,刘彩娟,等.海南霉素对瘤胃发酵模式、甲烷生成和微生物区系的影响[J].畜牧兽医学报,2012,43(2):242–249.

[27] COTTA M A,RUSSELL J B.Effect of peptides and amino acids on efficiency of rumen bacterial protein synthesis in continuous culture[J].Journal of Dairy Science,1982,65(2):226–234.

[28] SRINIVAS B,GUPTA B N.Rumen fermentation,bacterial and total volatile fatty acid (TVFA) production rates in cattle fed on urea-molasses-mineral block licks supplement[J].Animal Feed Science & Technology,1997,65(1/2/3/4):275–286.

[29] 米热古丽·伊马木,余雄,王改琴,等.葡萄籽精油对体外瘤胃发酵和甲烷生成的影响[J].畜牧与兽医,2012,44(1):4–7.

[30] 李冲,王宏博,李发弟,等.葡萄渣对羔羊瘤胃微生物区系和发酵功能的影响[J/OL].北京:中国科技论文在线(2017-04-14).http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201704-235.

[31] 李成云,袁英良,朴光一.缩合单宁对瘤胃挥发性脂肪酸及微生物生长的影响[J].饲料研究,2010(11):5–7.

[32] 李成云,袁英良,刘彩红.体外法研究榛子叶提取缩合单宁对蛋白质消化及瘤胃发酵的影响[J].黑龙江畜牧兽医,2010(17):103–104.
[33] WANG Y,BARBIERI L R,Berg B P,et al.Effects of mixing sainfoin with alfalfa on ensiling,ruminal fermentation and total tract digestion of silage[J].Animal Feed Science and Technology,2007,135(3/4):296–314.
[34] 潘发明,王彩莲,刘陇生,等.单宁在反刍动物饲料中的应用前景[J].中国畜牧兽医,2013,40(5):222–225.
[35] 孟庆翔,张洪军,戎易,等.估测饲料蛋白质瘤胃降解率活体外新方法的研究[J].中国农业大学学报,1991,4(4):95–101.
[36] 邸凌峰,曹雪,秦炜赜,等.两种含单宁饲草对反刍动物应用的价值研究[J].饲料工业,2017,38(7):43–50.
[37] 李晓鹏.缩合单宁对体外发酵特性的影响[D].硕士学位论文.兰州:甘肃农业大学,2009.
[38] 冯仰廉.反刍动物营养学[M].北京:科学出版社,2004.
[39] 吕忠蕾.不同分子量缩合单宁对延边黄牛瘤胃发酵及微生物区系的影响[D].硕士学位论文.延吉:延边大学,2014.
[40] RUSSI J P,WALLACE R J,NEWBOLD C J.Influence of the pattern of peptide supply on microbial activity in the rumen simulating fermenter (RUSITEC)[J].British Journal of Nutrition,2002,88(1):73–80.
[41] 陈丹丹,刁其玉,姜成钢,等.反刍动物甲烷的产生机理和减排技术研究进展[J].中国草食动物科学,2012,32(4):66–69.
[42] 王慧玲,王小平,尕藏桑智,等.单宁酸对绵羊瘤胃体外发酵和甲烷产量的影响[J].中国草食动物科学,2013,33(6):46–48.
[43] ANANTASOOK,王聪,晋大鹏.日粮添加含单宁和皂苷的雨树荚对奶牛瘤胃发酵和甲烷产量调控的影响[J].中国畜牧兽医,2014,41(2):152–152.
[44] GARCIA J L,PATEL B K C,OLLIVIER B.Taxonomic,phylogenetic,and ecological diversity of methanogenic archaea[J].Anaerobe,2000,6(4):205–226.

[45] 赵薇.中草药饲料添加剂对陕北白绒山羊生产性能和粪尿及甲烷排放的影响[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2014.
[46] WOOD T M,WILSON C A,MCCRAE S I,et al.A highly active extracellular cellulase from the anaerobic rumen fungus *Neocallimastix frontalis*[J].Fems Microbiology Letters,1986,34(1):37–40.
[47] 袁英良.日粮中添加缩合单宁对瘤胃发酵及饲料消化率的影响[D].硕士学位论文.延吉:延边大学,2010.
[48] 陈小连,刘建新,王佳堃,等.瘤胃纤维分解菌多纤维素酶体及其类似物的研究进展[J].中国畜牧杂志,2009,45(3):50–53.
[49] 刘占英.绵羊瘤胃主要纤维降解细菌的分离鉴定及不同氮源对其纤维降解能力的影响[D].博士学位论文.呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
[50] 王川.葡萄籽单宁的抗氧化性研究[J].食品科技,2009,34(2):184–187.
[51] 焦万洪,李莉.牛瘤胃内主要细菌结构与功能探查[J].中国畜禽种业,2016,12(2):84.
[52] 李大彪,张梅梅,于永强,等.单宁和聚乙二醇对绵羊和山羊瘤胃纤维降解菌数量的影响[J].动物营养学报,2015,27(2):596–605.

Effects of Grape Seed Procyanidine on Rumen Fermentation Parameters and Microflora of Dairy Cows *in Vitro*

YANG Delian[1] TONG Jinjin[1] ZHANG Jie[1] GUO Qi[1] JIANG Qihui[1] JIANG Linshu[1*] XIONG Benhai[2*]

（1. *Key Laboratory for Dairy Cow Nutrition, College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing* 102206, *China*; 2. *Institute of Animal Science and Veterinary, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing* 100193, *China*）

Abstract: The objective of this trial was to explore the effects of grape seed procyanidin on rumen fermentation parameters and microflora of dairy cows by *in vitro* culture method. The trial was divided into 6 groups. Total mixed ration with concentrate to forage ratio at 40∶60 was used as the

*Corresponding authors: JIANG Linshu, professor, E-mail:kjxnb@vip.sina.com; XIONG Benhai,professor, E-mail:xiongbenhai@caas.cn （责任编辑 王智航）

fermentation substrate. Grape seed procyanidin was added at levels of 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg, respectively. After fermented for 24 h, gas production was recorded, and rumen fermentation parameters and microorganism contents were determined. The results showed that compared with control group: 1) the supplementation of 0.4 and 0.5 g/kg grape seed procyanidin significantly decreased the contents of butyric acid and isovaleric acid of fermentation fluid ($P<0.05$), however, the supplementation of 0.2 g/kg grape seed procyanidin significantly increased the content of isobutyric acid of fermentation fluid ($P<0.05$); 2) the supplementation of different levels of grape seed procyanidin significantly increased rumen fluid pH ($P<0.05$); 3) the supplementation of different levels of grape seed procyanidin could inhibit gas production, and the effect in 0.3 g/kg group was significant ($P<0.05$); 4) grape seed procyanidin could significantly reduce the contents of protozoa（0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg groups）, methanogens（0.1, 0.2, 0.4 and 0.5 g/kg groups）, butyrivibrio fibrisolvens （0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg groups） and fibrobacter succunogene （0.1, 0.3, 0.4 and 0.5 g/kg groups） of fermentation fluid ($P<0.05$). In summary, the supplementation of grape seed procyanidin improves rumen fermentation pattern, has a significant effect on rumen microflora, and significantly inhibits methane production; the optimal supplemental level is 0.2 g/kg.

Key words： grape seed procyanidin; dairy cow; rumen fluid; *in vitro* fermentation; microflora